



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b><br>C12N 1/21, 15/70, 15/75<br>C12N 15/31, A61K 39/07   | <b>A1</b>  | <b>(11) Numéro de publication internationale:</b> WO 92/19720<br><b>(43) Date de publication internationale:</b> 12 novembre 1992 (12.11.92) |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR92/00397<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 30 avril 1992 (30.04.92)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>91/05417 2 mai 1991 (02.05.91) FR<br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).<br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> MOCK, Michèle [FR/FR]; 6, rue du Commandant-Lamy, F-75011 Paris (FR). CATALDI, Angel [AR/AR]; Quirno 115, 1406 Buenos Aires (AR). PEZARD, Corinne [FR/FR]; 54, rue Nationale, F-75013 Paris (FR).   | <b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Guttmann - Yves Plasseraud S.A., 67, Boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).<br><b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.<br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.<br/>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requies.</i> |  |
| <b>(54) Title:</b> IMMUNOGENIC RECOMBINANT STRAINS OF B. ANTHRACIS AND IMMUNOGENIC COMPOSITIONS CONTAINING SAME<br><b>(54) Titre:</b> SOUCHES RECOMBINANTES IMMUNOGENES DE B. ANTHRACIS - COMPOSITIONS IMMUNOGENES LES CONTENANT<br><b>(57) Abstract</b><br><p>A recombinant strain of <i>B. anthracis</i> is characterized in that it can induce the production of protective antibodies against virulent strains of <i>B. anthracis</i> in a human or animal host, and characterized also by the mutation of the pXO1 plasmid of at least one given gene coding for a protein which causes a toxic effect of <i>B. anthracis</i>, wherein said mutation leads to the deletion of all or part of said gene which codes for the protein causing the toxic effect, and to the insertion of a DNA cassette at said gene's deletion site in pXO1, whereby the strain thereby modified may be selected and a back mutation of the recombinant strain may be prevented, and wherein the gene thereby mutated is thereafter either unable to produce the protein causing the toxic effect for which it codes, or able to code for a truncated protein which has lost its toxic properties. The use of such a strain in immunogenic compositions is also described.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>L'invention concerne une souche recombinante de <i>B. anthracis</i>, caractérisée: par sa capacité à induire chez un hôte animal ou humain, la production d'anticorps protecteurs contre des souches virulentes de <i>B. anthracis</i>, la mutation du plasmide pXO1 d'au moins un gène donné codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez <i>B. anthracis</i>, cette mutation résultant en: la délétion de tout ou partie de ce gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique et, l'insertion au niveau du site de délétion de ce gène dans pXO1, d'une cassette d'ADN permettant la sélection de la souche ainsi modifiée et empêchant la réversion de la souche recombinante, le gène ainsi muté étant alors soit dépourvu de la capacité à produire la protéine responsable de l'effet toxique pour laquelle il code, soit capable de coder pour une protéine tronquée dépourvue de son caractère toxique. L'invention vise aussi l'utilisation d'une telle souche dans des compositions immunogènes</p> |  |  |

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | FI | Finlande                                   | ML | Mali                  |
| AU | Australie                 | FR | France                                     | MN | Mongolie              |
| BB | Barbade                   | GA | Gabon                                      | MR | Mauritanie            |
| BE | Belgique                  | GB | Royaume-Uni                                | MW | Malawi                |
| BF | Burkina Faso              | GN | Guinée                                     | NL | Pays-Bas              |
| BG | Bulgarie                  | GR | Grèce                                      | NO | Norvège               |
| BJ | Bénin                     | HU | Hongrie                                    | PL | Pologne               |
| BR | Brésil                    | IE | Irlande                                    | RO | Roumanie              |
| CA | Canada                    | IT | Italie                                     | RU | Fédération de Russie  |
| CF | République Centrafricaine | JP | Japon                                      | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | KR | République de Corée                        | SN | Sénégal               |
| CI | Côte d'Ivoire             | LI | Liechtenstein                              | SU | Union soviétique      |
| CM | Cameroun                  | LK | Sri Lanka                                  | TD | Tchad                 |
| CS | Tchécoslovaquie           | LU | Luxembourg                                 | TG | Togo                  |
| DE | Allemagne                 | MC | Monaco                                     | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark                  | MG | Madagascar                                 |    |                       |
| ES | Espagne                   |    |  |    |                       |

Souches recombinantes immunogènes de  
B. anthracis - Compositions immunogènes les  
contenant

La présente demande concerne des souches recombinantes immunogènes et non toxicogènes de Bacillus anthracis et des compositions immunogènes les contenant.

Bacillus anthracis (B. anthracis) est responsable chez l'animal et chez l'homme, de la maladie du charbon qui existe sous forme cutanée, respiratoire et digestive. Les formes graves de cette maladie peuvent conduire à la mort du sujet infecté. La pathogénicité de B. anthracis s'exprime selon deux aspects : un effet toxique se manifestant par l'apparition d'un oedème, et un effet toxique dit létal pouvant conduire à la mort du sujet infecté. Ces effets sont attribués à la présence dans B. anthracis de trois facteurs protéiques agissant en combinaison par deux. L'un des trois facteurs est présent dans les deux combinaisons et intervient dans la fixation des toxines de B. anthracis sur la membrane de l'hôte. Les deux autres facteurs protéiques constituent les éléments actifs responsables de la manifestation soit de l'effet toxique de type oedème soit de l'effet toxique à caractère létal. Ces deux facteurs sont appelés respectivement facteur oedématogène (abréviation anglaise : EF) et facteur létal (abréviation anglaise : LF).

Le facteur responsable de la fixation membranaire est appelé antigène protecteur (abréviation anglaise PA) car on lui avait initialement attribué la capacité de conférer une protection active contre la maladie, lors de tests d'immunisation.

Les trois facteurs PA, LF et EF ont été purifiés (FISH et al 1968a J. Bacterial 95: 907-917) et les deux

toxines obtenues par combinaison de PA et LF d'une part, PA et EF d'autre part ont été décrites par LEPPLA et al (1982, PNAS - USA 79-3162-3166).

On savait également que les trois gènes pag, cya et lef codant respectivement pour les facteurs PA, EF et LF sont répartis sur un plasmide pX01 de B. anthracis décrit par MIKESELL P. et al (1983 Infect. Immun 39, 371-376).

Un autre plasmide pX02 a été mis en évidence chez B. anthracis; il comporte notamment les séquences d'ADN codant pour les éléments de la capsule du bacille.

Les gènes pag, cya et lef ont été clonés et séquencés. Ces résultats ont été rapportés respectivement par WELKOS et al, 1988 dans Gene, 69: 287-300, par ESCUYER et al, 1988 dans Gene, 71: 293-298, et par BRAGG et al, 1989, Gene, 81: 45-54.

En outre CATALDI et al (Molecular Microbiology 1990 4(7), 1111-1117) ont décrit la construction et la caractérisation d'une souche de B. anthracis dépourvue du plasmide pX02 et dépourvue de l'antigène PA par modification du plasmide pX01.

Pour réaliser cette construction CATALDI et al ont utilisé un vecteur navette mobilisable, transférable par conjugaison de E. coli à B. anthracis. Ce vecteur comportait d'une part le gène codant pour la protéine PA, muté par délétion d'un fragment de taille inférieure à 50 bp et d'autre part une cassette d'ADN reporteur portant un gène de résistance à l'érythromycine (Erm<sup>r</sup>) insérée au niveau du site de la délétion.

Le vecteur ainsi formé était introduit par conjugaison dans B. anthracis 7702 (Souche Sterne) et les transconjugants ayant subi une recombinaison homologue entre le vecteur introduit et le plasmide

pX01 aboutissant à l'introduction d'un gène pag inactif dans pX01 à la place du gène pag d'origine, ont été sélectionnés.

Selon les auteurs de la publication, la construction réalisée a permis de montrer que l'absence d'expression de PA est suffisante pour abolir totalement le caractère létal de B. anthracis et aussi de confirmer que PA joue un rôle central, permettant la pénétration de EF ou de LF dans les cellules eucaryotes.

Selon les auteurs de cet article publié, des recherches complémentaires sont nécessaires pour donner des informations sur l'expression du caractère pathogène de B. anthracis et sur les éléments susceptibles d'intervenir dans l'immunisation contre ce bacille.

Des données sur PA pouvant apparaître contradictoires étaient en effet disponibles dans l'art antérieur, établissant d'une part que PA est le composant principal parmi les facteurs de la toxicité, requis pour la protection contre B. anthracis et d'autre part qu'un vaccin vivant à base de spores de souche Sterne est plus efficace qu'une préparation acellulaire de PA.

A partir de là les auteurs ont conclu à la nécessité de clarifier le rôle des composants des toxines ou d'autres antigènes pour rechercher quelle pourrait être une protection efficace contre des souches virulentes de B. anthracis.

D'après une autre publication (M. MOCK Annales de l'INSTITUT PASTEUR, Décembre 1990) des analyses d'échantillons de sérum de patients infectés par B. anthracis ont permis de mettre en évidence des anticorps dirigés contre PA, EF et LF, ce dernier

facteur déclenchant la réponse la plus importante. La conclusion de l'article est que LF est un immunogène puissant.

Les données disponibles tant sur la pathogénicité de B. anthracis que sur les éléments intervenant dans l'immunisation n'ont pas permis jusqu'à présent de réellement déterminer ce que pourrait être une composition vaccinnante protectrice contre B. anthracis.

Les résultats connus jusqu'à présent permettaient d'envisager qu'une telle composition pouvait contenir des souches de B. anthracis vivantes. Cependant les résultats décrits dans les articles cités ci-dessus ne permettaient pas de définir dans quelles conditions ces souches devaient être utilisées pour tirer le bénéfice de leurs composants supposés immunogènes (en particulier LF selon l'article de MOCK) sachant que PA était reconnu comme jouant un rôle central parmi les facteurs de la toxicité, afin de déclencher la réponse immunitaire protectrice chez l'animal ou chez l'homme, ces souches étant en outre, non toxiques et stables chez l'hôte.

Les inventeurs de la présente demande ont recherché et mis au point des compositions immunogènes capables d'induire des anticorps protecteurs chez l'animal. Contrairement au cas de la souche recombinante PA- de B. anthracis décrite dans l'article précité de CATALDI et al, dans lequel la mutation du plasmide pX01 de B. anthracis portait sur un élément non directement responsable de la toxicité, les inventeurs ont émis l'hypothèse selon laquelle une souche de B. anthracis dépourvue d'au moins l'un de ses facteurs de toxicité facteur responsable de la pathogénicité et généralement impliqué dans la réaction de production d'anticorps protecteurs, pourrait entrer

dans la constitution d'une composition immunogène et protectrice contre B. anthracis.

En dépit de la constatation selon laquelle le facteur létal LF serait un immunogène puissant (MOCK, Annales de l'INSTITUT PASTEUR), les inventeurs ont notamment préparé et caractérisé une souche recombinante de B. anthracis dans laquelle le gène codant pour la protéine LF est muté de façon à ne plus être exprimé dans la bactérie ou de façon à s'exprimer sous la forme d'une protéine tronquée inactive. Ils ont constaté que la mutation du plasmide pX01 au niveau gène lef n'altérerait pas les fonctions autres que celles liées à l'expression de LF dans B. anthracis.

De même ils ont montré qu'une mutation du gène cya responsable du second effet toxique, pouvait conduire à la production de souches de B. anthracis recombinantes intéressantes pour la préparation de vaccins.

En conséquence une modification des composants de la toxicité de B. anthracis conduisant à leur disparition ou à leur inactivation n'altère pas la potentialité de souches de B. anthracis d'être immunogènes et de protéger contre l'infection par ce bacille.

L'invention concerne donc une souche recombinante de B. anthracis, caractérisée par :

- sa capacité à induire chez un hôte animal ou humain, la production d'anticorps protecteurs contre des souches virulentes de B. anthracis,
- la mutation d'au moins un gène donné sur le plasmide pX01 codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez B. anthracis, cette mutation résultant en :
  - . la délétion de tout ou partie de ce gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique et,

. l'insertion au niveau du site de délétion de ce gène dans pX01, d'une cassette d'ADN permettant la sélection de la souche ainsi modifiée et empêchant la réversion de la souche recombinante, le gène ainsi muté étant alors soit dépourvu de la capacité à produire la protéine responsable de l'effet toxique pour laquelle il code, soit capable de coder pour une protéine tronquée dépourvue de son caractère toxique.

Le terme "anticorps protecteur" désigne dans le cadre de l'invention des anticorps capables de conférer une protection contre les souches virulentes de B. anthracis, lorsqu'ils sont produits chez un hôte animal ou humain. Ce sont donc en particulier des anticorps neutralisants vis à vis de B. anthracis.

On appelle protéine responsable d'un effet toxique de la souche B. anthracis, une protéine qui entre dans la composition d'une toxine et est nécessaire à la manifestation soit d'un oedème soit de la toxicité létale même si cet effet résulte de la combinaison des activités de plusieurs facteurs. Deux protéines répondent en particulier à cette définition : la protéine EF et la protéine LF qui contribuent à la formation des toxines, constituées respectivement dans ce cas par les combinaisons PA + EF et PA + LF.

La cassette d'ADN insérée dans le gène délété est une séquence d'ADN qui permet de vérifier l'intégration du gène délété dans le plasmide pX01, puisque cette cassette est insérée au niveau du site de délétion du gène.

La délétion d'au moins une partie du gène codant pour la protéine à effet toxique empêche que la souche recombinante ainsi obtenue ne retrouve son état naturel d'origine par réversion, et par conséquent puisse à



nouveau exprimer la protéine codée par le gène en question ou la produise sous une forme active.

La mutation du plasmide pX01 au niveau de l'un des gènes codant pour EF ou LF est réalisée de façon particulièrement avantageuse grâce à la mise en oeuvre d'une étape intermédiaire faisant intervenir un vecteur portant lui même le gène cya ou lef muté qui par recombinaison homologue permettra de modifier pX01 respectivement au niveau du gène cya ou lef. Il est cependant entendu que toute technique permettant de procéder à la mutation recherchée du gène cya ou du gène lef peut être utilisée, qu'elle soit directe ou non.

Une première famille de souches recombinantes B. anthracis selon l'invention répondant à la définition précédente, est caractérisée en ce que outre les caractéristiques précédentes, la souche est dépourvue du plasmide pX02. Ce plasmide pX02 est en particulier nécessaire à la formation de la capsule de B. anthracis et son absence permet d'atténuer la virulence de la souche naturelle.

On peut citer parmi les souches dépourvues de ce plasmide la souche Sterne 7702 décrite dans l'article de CATALDI et al (Molec. Microbiology 1990 4(7), 1111-1117 et Sterne 1939 Onderstepoort J Vet Sci Anim Indust 13: 313-317).

Selon un premier mode de réalisation avantageux de l'invention, une souche recombinante de B. anthracis est une souche dont le gène lef du plasmide pX01, codant pour la protéine létale LF est muté. Une telle souche recombinante exprime la toxine formée par la combinaison PA + EF. Dans ce cas la protéine LF n'est plus exprimée ou est exprimée sous forme d'une protéine inactive. Cette souche qui sera désignée dans la suite

par souche LF<sup>-</sup> s'est avérée être une souche stable chez l'animal et capable d'induire des anticorps protecteurs contre B. anthracis.

Les inventeurs ont remarqué qu'une délétion au niveau du gène lef dans les conditions exposées ci-dessus, ne modifie pas les propriétés de la bactérie en dehors de l'absence de toxicité résultant de la modification au niveau de la protéine LF et n'est en outre pas létale pour la bactérie.

Une souche recombinante de B. anthracis particulièrement préférée dans le cadre de la mise en oeuvre de l'invention est donc caractérisée en ce qu'elle est capable d'exprimer les protéines PA et EF et en ce qu'elle n'exprime pas la protéine LF.

A cet égard l'invention concerne en particulier la souche LF<sup>-</sup> (RP10) déposée le 2 Mai 1991 à la CNCM (Collection Nationale de Culture et de Microorganismes) sous le numéro I-1095.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention les souches recombinantes de B. anthracis sont caractérisées en ce que le gène muté de pX01 est le gène cya codant pour la protéine oedématogène EF.

Dans ce cas le plasmide pX01 soit n'exprime pas la protéine EF, soit l'exprime sous une forme tronquée inactive s'agissant de son caractère toxique.

Une souche EF<sup>-</sup> préférée est la souche RP9 déposée le 2 Mai 1991 à la CNCM sous le numéro I-1094.

On obtient en particulier des souches produisant uniquement la toxine PA + LF. Dès lors que le caractère létal de la protéine LF peut être contrôlé, ces souches peuvent être utilisées pour la production de compositions immunogènes.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la souche recombinante de B. anthracis entrant dans

l'un des groupes ci-dessus définis, est caractérisée en ce que le plasmide pX01 est en outre muté au niveau du gène codant pour la protéine PA, de façon telle que cette protéine soit n'est pas exprimée dans la souche recombinante, soit n'est pas fonctionnelle dans la souche recombinante, s'agissant de son rôle dans l'activité toxique de la souche par fixation aux membranes cellulaires de l'hôte.

Conformément à ce mode de réalisation, la souche formée produit uniquement la protéine EF ou uniquement la protéine LF ou l'une de ces protéines accompagnées d'une protéine PA inactive s'agissant de la toxicité. En conséquence l'induction de l'effet toxique résultant de la pénétration de B. anthracis dans les cellules par l'intermédiaire de la protéine PA ne peut avoir lieu et l'effet toxique dû à LF ou EF ne peut se manifester.

Une souche ainsi définie déficiente en PA, du moins sous forme active est la souche RP8 déposée à la CNCM sous le n°I-1093, le 2 Mai 1991.

D'autres souches intéressantes dans le cadre de l'invention, comportent une mutation au niveau de plusieurs des facteurs protéiques impliqués dans la pathogénicité des B. anthracis. En particulier ces souches peuvent être "doublement mutantes" et à cet égard on citera les souches RP31 (EF<sup>+</sup>, LF<sup>-</sup>, PA<sup>-</sup>), RP4 (LF<sup>+</sup>, EF<sup>-</sup>, PA<sup>-</sup>) et RP42 (PA<sup>+</sup>, EF<sup>-</sup>, LF<sup>-</sup>).

De telles souches peuvent donc être également intéressantes pour la production de vaccins.

La cassette d'ADN intégrée dans la souche B. anthracis recombinante au niveau de pX01 porte, selon un premier mode de réalisation de l'invention, un gène de résistance à un antibiotique et notamment un gène de résistance à la kanamycine. D'autres résistances

peuvent être mises en oeuvre, par exemple par le biais de la résistance à l'érythromycine.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, cette cassette est pourvue d'un marqueur métabolique et sa présence dans la souche recombinante est vérifiée par une réaction du type enzyme-substrat.

Quelle que soit sa nature la cassette permet la sélection des souches de B. anthracis ayant subi une mutation au niveau de pXO1.

Le fragment délété du gène impliqué dans l'activité toxique au niveau de pXO1 peut être constitué par tout ou partie du gène cya ou du gène lef en particulier. La taille du fragment délété est avantageusement supérieure à 0,1 kb si l'on recherche l'absence de production de la protéine naturellement codée par le gène et ce sans tenir compte de la partie du gène indispensable à l'expression de cette protéine.

De façon avantageuse le fragment délété du gène cya ou du gène lef est un fragment d'au moins 0,5 kb de préférence supérieur à 1 kb. La délétion peut concerner le promoteur des gènes cya ou lef mais elle comprend aussi la délétion d'une partie de la séquence codante de la protéine afin d'éviter notamment toute réversion du gène délété.

Il est entendu que des souches recombinantes de B. anthracis peuvent également être caractérisées par une mutation du plasmide pXO1 par mutation des deux gènes lef ou cya, selon ce qui est décrit plus haut pour chacun des gènes. Ces souches peuvent être mises en oeuvre dans le cadre de l'invention pour la production d'anticorps protecteurs.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, la souche recombinante de B. anthracis est encore caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un

acide nucléique hétérologue le cas échéant muté, codant pour un facteur déterminé immunogène, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans B. anthracis.

Ce gène hétérologue code pour un facteur dit immunogène, capable de conduire la production d'anticorps chez un hôte chez lequel B. anthracis recombinante est administrée. Ce facteur immunogène peut bénéficier le cas échéant de l'environnement apporté par B. anthracis dans lequel il est exprimé, pour conduire à la production des anticorps neutralisants.

En d'autres termes le facteur hétérologue est immunogène en tant que tel ou est constitué par un haptène rendu immunogène du fait de son expression au sein de B. anthracis et/ou du fait de son association à une molécule porteuse. Dans ce cas la souche recombinante de B. anthracis se comporte comme un vecteur de l'immunogénicité ou une souche porteuse.

De façon intéressante on pourra donc associer dans B. anthracis les séquences nucléotidiques mutées du plasmide pX01 avec un acide nucléique hétérologue codant pour toute séquence d'acides aminés susceptible de présenter un intérêt en médecine vétérinaire ou humaine du point de vue de la vaccination.

La séquence hétérologue peut être transférée dans B. anthracis au moyen d'un plasmide, notamment d'un plasmide de conjugaison répliquable et mobilisable.

A la suite de son intégration dans B. anthracis cette séquence peut être maintenue sur ce plasmide exogène ou au contraire intégrée par exemple dans l'ADN plasmidique de pX01 dans des conditions n'affectant pas les caractéristiques de la souche recombinante modifiée selon ce qui précède au niveau de sa toxicité.

De façon avantageuse les souches recombinantes de B. anthracis peuvent être conservées et utilisées sous forme de spores. Les spores représentent en effet un mode de conservation intéressant du fait de leur caractère transitoirement latent. Une fois administrées à l'hôte animal ou humain ces spores germent pour donner la bactérie recombinante.

L'invention a également pour objet une composition immunogène permettant la production d'anticorps neutralisants et protecteurs vis à vis de B. anthracis chez l'hôte auquel elle est administrée, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif une souche recombinante de B. anthracis selon l'invention, en mélange avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

A titre d'exemple de composition immunogène, on peut citer celle qui comprendrait, à titre de principe actif, la souche RP42 ou la souche RP9.

L'invention vise aussi une composition de vaccin mixte caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une souche recombinante de B. anthracis de l'invention dans des conditions telles que son administration à un hôte déterminé permet la production d'anticorps protecteurs à la fois contre une infection par B. anthracis et contre l'organisme dont est issue la séquence d'acides aminés hétérologue.

De telles compositions peuvent être administrées par injection ou par tout mode d'administration habituellement utilisé pour la vaccination.

De façon avantageuse elles peuvent également comporter un adjuvant permettant d'augmenter le niveau de la réaction.

Les doses administrables en particulier chez l'animal, de ces compositions, seront déterminées en fonction de l'animal que l'on cherche à protéger. On

estime que l'administration de doses allant de 10 jusqu'à 100 fois, voire plus, la dose de souche Sterne utilisée ( $10^6$  souches chez la souris), peut être envisagée.

Entre également dans le cadre de l'invention un vecteur recombinant, notamment choisi parmi les vecteurs de type conjugatif capable d'infecter à la fois des bactéries Gram-négatives et des bactéries Gram-positives en particulier E. coli et B. anthracis, stable et non intégratif chez B. anthracis et comprenant en un site non essentiel pour sa répllication, d'une part une séquence mutée d'au moins un gène codant pour une protéine responsable de l'effet toxique des toxines de B. anthracis, de telle façon qu'elle ne permet pas la production de cette protéine ou que cette protéine est produite sous une forme inactive s'agissant de l'effet toxique, et d'autre part une cassette d'ADN susceptible de se comporter comme un reporteur, par exemple en conférant une résistance à un antibiotique par exemple la kanamycine ou en permettant une réaction métabolique sur un substrat donné, lorsque ce vecteur est introduit chez B. anthracis.

Un vecteur recombinant préféré est le vecteur dans lequel le gène muté de pX01 est le gène cya. Selon un autre mode de réalisation intéressant de l'invention, ce vecteur recombinant comporte le gène lef muté au niveau plasmide pX01.

D'autres vecteurs recombinants utilisables sont caractérisés en ce que le plasmide pX01 est muté au niveau de deux gènes, par exemple au niveau des gènes LF et PA, ou EF et PA ou EF et LF.

Des vecteurs particulièrement intéressants pour la réalisation de l'invention sont le plasmide PMMA110 et le plasmide pCPL110.

Le vecteur recombinant selon l'invention peut également contenir outre les séquences précédemment décrites, un ADN hétérologue codant pour une protéine immunogène déterminée.

L'invention concerne de plus un procédé pour la préparation d'une souche recombinante de B. anthracis répondant aux définitions ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

- la modification de souches déterminées de B. anthracis par un vecteur recombinant tel que ci-dessus décrit dans des conditions permettant l'intégration de la séquence mutée du gène cya ou de la séquence mutée du gène lef ainsi que de la cassette reporteur au niveau du plasmide pX01 et le cas échéant de l'acide nucléique hétérologue, de façon telle que la séquence cya mutée ou la séquence lef mutée est insérée par recombinaison homologue dans pX01 respectivement au niveau du gène cya ou du gène lef d'origine,
- la récupération des souches B. anthracis recombinantes, après élimination du vecteur recombinant non intégré dans pX01.

Entrent également dans le champ de l'invention les séquences d'ADN codant pour une protéine responsable de l'effet toxique de B. anthracis, caractérisées en ce qu'elles sont mutées par délétion dans des conditions telles que la protéine pour laquelle elles codent naturellement n'est pas produite ou est produite sous une forme tronquée inactive s'agissant de la toxicité, en particulier ce qu'il s'agit des séquences codantes du gène lef ou du gène cya.

L'invention vise également le plasmide pX01 muté selon ce qui a été défini précédemment au niveau du gène lef ou du gène cya.



D'autres avantages et propriétés de l'invention apparaissent également dans les figures et les exemples qui suivent.

Figure 1 : schéma de la mutagenèse du gène cya (A) et du gène lef (B)

Figure 2 : protéines contenues dans différents surnageants de cultures de B. anthracis analysé par immunoblot et vérification avec des immunosérums anti EF (A/), anti LF (B/) ou anti PA (C/)

Echantillons 20 µg de :

- 1/7702 souche de B. anthracis
- 2/ EF<sup>-</sup> souche de B. anthracis
- 3/ PA<sup>-</sup> souche de B. anthracis
- 4/ LF<sup>-</sup> souche de B. anthracis

## E X E M P L E S

I - CONSTRUCTION DE SOUCHES MUTANTESMATERIELS ET METHODESSouches bactériennes, plasmides et milieux de cultures

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont répertoriés dans le tableau I. Le vecteur de conjugaison navette entre *Escherichia coli* et *Bacillus anthracis* est pAT18, utilisé dans ces expériences pour transformer *B. anthracis*. Il contient un gène de résistance à l'érythromicine capable de s'exprimer à la fois dans les bactéries Gram négatives et les bactéries Gram positives.

Des milieux L broth ou L agar ont été utilisés pour cultiver *E. coli* (Miller 1972, Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory). *B. anthracis* a été cultivé en routine dans un milieu BHI (Difco laboratories) ou dans un milieu NBY pour la préparation des spores. Un milieu R (Ristroph et Ivins 1983, Inf. Imm. 39:483-486) a été mis en oeuvre pour la production de toxines. Les antibiotiques ont été utilisés à la concentration suivante : ampicilline à 100 µg/ml dans une culture de *E. coli*; kanamycine à 50 µg/ml et 20 µg/ml respectivement dans des cultures de *E. coli* et de *B. anthracis*; érythromycine à 180 µg/ml et 10 µg/ml pour des cultures de *E. coli* et de *B. anthracis* respectivement.

### Techniques ADN

pXO1 a été préparé conformément à la méthode de Green et al 1985 (Inf. Imm. 49: 291-297). La préparation de l'ADN plasmidique de E. coli et de B. anthracis a été réalisée selon la méthode de Birnboim et Doly (Methods for recombinant DNA technology Maniatis et al 1982). La cassette d'ADN conférant la résistance à la kanamycine a été préparée en utilisant le kit Geneclean (Bio 101, La Jolla, Californie) après électrophorèse sur gel d'agarose.

### Procédure de conjugaison

Les plasmides navettes recombinants ont été transférés par conjugaison dans B. anthracis 7702 (souche Sterne). Le système de conjugaison par filtres de Trieu Cuot et al (1987 FEMS Microbiology Letters 48, 289-294) a été utilisé conformément à la description de Cataldi et al. E. coli et B. anthracis ont été cultivés dans des milieux L et BHI.  $5 \times 10^8$  cellules de E. coli et  $10^8$  cellules de B. anthracis ont été mélangées, lavées pour éliminer les antibiotiques et chargées sur un filtre Millipore de  $0,45 \mu$  placé sur de l'agar BHI. Après 15 heures d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , les cellules ont été resuspendues et étalées sur un milieu sélectif contenant les antibiotiques appropriés. La résistance de B. anthracis aux colicines E3 et D a été utilisée pour sélectionner par comptage les donneurs sensibles à E. coli. L'ADN plasmidique a été purifié des transconjugants et utilisé pour transformer E. coli. Les plasmides ont été testés pour vérifier l'absence de réarrangements, par analyse avec des enzymes de restriction.

### Isolement de souches mutantes de B. anthracis

Les souches mutantes de B. anthracis ont été obtenues par culture pendant plusieurs générations en l'absence d'érythromycine mais en présence de kanamycine pour sélectionner les événements de recombinaison entre le gène muté contenant la cassette et pX01 et pour sélectionner les souches ayant perdu le plasmide recombinant. Parmi tous les clones testés résistants à la kanamycine, tous étaient sensibles à l'érythromycine et dépourvus de plasmides. La caractérisation des recombinants a été complétée en préparant l'ADN de pX01 et en sous-clonant les gènes inactivés dans pUC18 dans E. coli. L'ADN plasmidique a été purifié à partir des transformants Kan<sup>r</sup>-Amp<sup>r</sup> (résistants à la kanamycine-résistants à l'ampicilline) et testé pour l'absence de réarrangements, par analyse avec des enzymes de restriction.

### Test adénylate cyclase

L'adénylate cyclase a été testée dans des surnageants de culture de B. anthracis dans des milieux R comme décrits par Ladant 1988(J Biol Chem 263:2612-2618). L'activité enzymatique est exprimée en unité/ml correspondant à 1 nM/min/ml.

### Analyse protéique

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% en présence de SDS a été réalisée selon la description de Laemmli 1970. Les gels ont été soit colorés avec le bleu de coomassie soit soumis à une analyse en immunoblot (Towbin et al 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354). Des western blot ont été effectués

avec un sérum obtenu à partir de lapins immunisés soit avec la protéine EF62 soit avec la protéine LF de B. anthracis purifiée à partir du gel. Les protéines immunodétectées ont été visualisées en utilisant la protéine A marquée avec  $^{125}\text{I}$  et par autoradiographie avec des films à rayon X.

#### Préparation des spores

Pour la préparation de spores de B. anthracis, on strie une colonie sur un milieu NBY en gélose inclinée et on incube pendant 7 jours à 30°C. La formation des spores a été contrôlée par examen au microscope. 5ml d'eau distillée stérile ont été ajoutés à chaque tube. La suspension de spores a été transférée dans un tube stérile incubée dans de l'eau à 65°C pendant 30 minutes pour tuer tous les bacilles pouvant exister dans cette culture. La culture contenant au moins 90% de spores et  $10^8$  CFU/ml a été collectée par centrifugation et suspendue dans l'eau (1/20 v/v de la culture d'origine). Les dilutions de l'ensemble des spores ont été étalées pour comptage de spores viables sur un milieu agar BHI. L'ensemble des spores a été divisé en parties aliquotes en 5 ml et conservé à 4°C.

Avant chaque expérience d'infection, les parties aliquotes ont été diluées dans de l'eau physiologique et les dilutions ont été étalées sur une boîte d'agar BHI pour détermination par comptage de la viabilité.

Les spores de B. subtilis ont été préparées de la même manière.

Infection des souris

Des souris suisses femelles âgées de 3 à 6 semaines, non contaminées ont été fournies par le laboratoire Saint Aubin Les Elboeuf, France. Les animaux ont été nourris avec de l'eau stérilisée complétée par des vitamines (pH 3). La mortalité a été suivie en inoculant par voie sous-cutanée (sc) des groupes de 10 souris avec des dilutions appropriées de suspension de spores (dans un volume de 0,2 ml) obtenues à partir de la souche parentale ou des mutants. La virulence a été estimée en déterminant la dose létale à 50% (LD 50) sur des groupes de souris âgées de 3 à 10 semaines par la méthode statistique. La survie des bactéries a été suivie dans les tissus de l'hôte en infectant les souris au niveau du coussinet plantaire droit (dans un volume de 0,1 ml) avec de fortes doses de suspension de spores provenant des souches testées. Des groupes de 5 souris ont été sacrifiés à intervalles donnés et leurs pieds ont été sectionnés, lavés dans des solutions d'hypochlorure de sodium (1 min) pour tuer les contaminants de la peau et avec du PBS stérile pH 7,2 (1 min). Ensuite des volumes de 0,1 ml des dilutions en série (10 fois) ont été étalés sur un mélange gélosé contenant de la trypticase. Les colonies ont été comptées après 16 heures d'incubation à 37°C et les résultats ont été exprimés sous la forme du log 10 des comptages bactériens par pied. En même temps la réaction d'inflammation induite dans le coussinet plantaire des souris infectées a été mesurée à intervalles donnés en utilisant un pied à coulisse (Schelltaster, Hessen).

RESULTATSConstruction des souches mutantes de B. anthracis  
déficientes en toxine EF ou en toxine LF

Les gènes codant pour la protéine LF (gène lef) ou pour la protéine EF (gène cya) ont été inactivés conformément à la technique de Cataldi à la fois par délétion et par insertion d'une cassette résistante à la kanamycine. La construction réalisée initialement dans E. coli a été transférée par conjugaison dans la souche Sterne 7702 de B. anthracis. Le gène cya cloné et séquencé (Mock et al 1988 Gene 64:277-284) a été souscloné dans E. coli dans le plasmide pUC8 (pMM861).

Le plasmide recombinant pMM861 (Labruyère et al 1990 Biochemistry 29:4922-4928) codant pour le locus cya a été soumis à une digestion enzymatique partielle au niveau du site Hind III de façon à créer un fragment de délétion Hind III de 1 Kb à l'intérieur du gène cya. Le plasmide a ensuite été coupé en son site BglIII unique dans le gène et la cassette d'ADN de 1 Kb conférant la résistance à la kanamycine a été liguée au plasmide. Le plasmide recombinant résultant pMMA862 a été caractérisé à partir de transformants E. coli Amp<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>. Les profils de la préparation plasmidique pMMA862 obtenus avec les enzymes de restriction ont montré que le gène cya était muté conformément à ce que l'on souhaitait. Ensuite un fragment de 4,2 Kb EcoRI-BamHI du plasmide pMMA862 a été inséré dans le plasmide navette mobilisable pAT18 (Erm<sup>r</sup>) (pMMA110).

La mutagenèse du gène lef a été réalisée de façon similaire. Le gène lef est contenu dans un fragment SacI-ClaI de 3,5 Kb du plasmide pX01 de B. anthracis. Ce fragment a été tout d'abord cloné dans pUC18 et a

permis d'exprimer le gène lef dans des cellules E. coli portant le plasmide correspondant pCPL11. Le fragment de 3,5 Kb a ensuite été inséré dans pAT18 (pCPL100). Le plasmide recombinant pCPL100 a été soumis à une digestion enzymatique partielle avec EcoRI de façon à créer un fragment de délétion EcoRI de 0,8 Kb à l'intérieur du gène. Le plasmide résultant a été coupé à son site XhoI unique à l'intérieur de lef et la cassette Kan<sup>r</sup> a été liguée au plasmide. Le plasmide recombinant correspondant pCPL110 a été caractérisé à partir des transformants E. coli, Erm<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>. Le profil des enzymes de restriction de pCPL110 a montré que le gène lef était muté comme on le souhaitait.

Les gènes inactivés ont ensuite été transférés dans B. anthracis 7702 : PMMA110 et pCPL110 portant respectivement les gènes mutés cya et lef ont permis de transformer E. coli HB101 portant pRK212.1 pour la mobilisation. La stratégie de transformation par le vecteur développé par Trieu Cuot a été utilisée entre E. coli et la souche B. anthracis 7702 de Sterne de façon à transférer les constructions d'ADN faites dans E. coli, vers B. anthracis par conjugaison.

Bien que les fréquences de transfert aient été faibles ( $10^{-8}$ ) des transconjugants B. anthracis Kan<sup>r</sup>, Erm<sup>r</sup> ont été obtenus. Les événements de recombinaison homologue entre PMMA110 ou pCPL110 et pXO1 ont ensuite été sélectionnés pour vérifier l'introduction du gène cya inactif ou du gène lef inactif dans pXO1. Pour cela, les transconjugants ont été cultivés sur plusieurs générations sans érythromycine (Erm) (antibiotique de sélection pour le plasmide navette) mais en présence de kanamycine (Kan) (sélectif pour la cassette). Tous les clones testés conformément à cette procédure étaient sensibles à Erm et résistants à Kan,



montrant la perte de PMMA110 ou de pCPL110 et l'intégration de la cassette Kan<sup>r</sup> dans pX01. Les souches *B. anthracis* présumées recombinantes EF<sup>r</sup> ou LF<sup>r</sup> portant respectivement pX01-cya<sup>r</sup> ou pX01-lef<sup>r</sup> ont été d'abord caractérisées selon la technique décrite dans la partie Matériels et Méthodes par analyse avec les enzymes de restriction puis par le test de l'adénylate cyclase et des expériences d'immunoblot.

Production des toxines PA, LF et EF dans les surnageants de culture des souches mutantes de *B. anthracis*

L'activité adénylate cyclase du composant EF a été déterminée dans différentes souches de *B. anthracis* (tableau 2). Aucune activité n'a été détectée dans les surnageants de culture de la souche mutante EF<sup>r</sup>, confirmant ainsi l'inactivation du gène cya sur pX01. Dans le surnageant de culture de la souche mutante LF<sup>r</sup>, l'activité adénylate cyclase était la même (200 u/ml) que l'activité trouvée habituellement dans les surnageants de culture des souches 7702.

Les souches mutantes *B. anthracis* étaient ensuite caractérisées par analyse immunoblot en utilisant un sérum dirigé contre PA, EF ou LF. Les sérums ont été obtenus conformément à la procédure décrite dans Matériels et Méthodes. Comme le montre la figure 2, les trois protéines composant les deux toxines de *B. anthracis*, PA, EF et LF sont produites dans *B. anthracis* 7702 lorsque les bactéries sont cultivées sur un milieu R dans des conditions définies. Aucun composant apparenté à LF n'a été produit par les souches mutantes LF<sup>r</sup> alors que PA et EF étaient produites. De plus aucun composant apparenté à EF n'a été détecté dans les surnageants des souches mutantes

EF<sup>-</sup>, confirmant l'absence d'activité adénylate cyclase dans les surnageants de culture des mutants EF<sup>-</sup> (tableau 2). Dans les surnageants de culture des mutants PA<sup>-</sup>, aucun composant apparenté à PA n'a été détecté alors que LF et EF étaient encore produites.

Virulence des différentes souches de B. anthracis dans les souris

Des groupes de 10 souris suisses ont été inoculés sc avec des doses croissantes de différentes souches de B. anthracis, et la mortalité a été suivie pendant 15 jours. La souche 7700 correspondant à la souche Sterne 7702 dépourvue du plasmide pX01 codant pour les toxines était totalement avirulente (LD 50 10<sup>9</sup>), comme le sont les souches mutantes PA<sup>-</sup> obtenues par Cataldi. L'inactivation de EF a infléchi de façon significative la LD 50 par une unité 1,0 log (LD 50 10<sup>7</sup> spores par souris contre 10<sup>6</sup> spores par souris pour la souche 7702 Sterne). Ceci indique que l'expression de la virulence était partiellement affectée par l'absence de l'adénylate cyclase. Au contraire la létalité était totalement abolie en l'absence du facteur léthal puisque les souches de B. anthracis mutantes LF<sup>-</sup> étaient avirulentes (LD 50 10<sup>9</sup>). La souche mutante LF<sup>-</sup> totalement avirulente mais produisant néanmoins la toxine de l'oedème (PA + EF) pouvait induire l'oedème de la peau après injections sous-cutanées, alors que les souches mutantes PA<sup>-</sup> ou EF<sup>-</sup> n'induisaient pas d'oedème. Il était important de vérifier in vivo cette propriété et pour cela des souris ont été inoculées avec différentes souches de B. anthracis (10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> ou 10<sup>6</sup> spores par souris) dans le coussinet plantaire droite. L'intensité de l'oedème dans le coussinet plantaire a été mesurée avec un pied à coulisse. Les

résultats obtenus sont rapportés à la figure 2. La souche mutante LF<sup>-</sup> était capable d'induire l'oedème de la peau comme la souche Sterne 7702. Au contraire les souches mutantes de B. anthracis 7700 PA<sup>-</sup> ou EF<sup>-</sup> n'induisaient pas l'oedème de la peau. Pour toutes les souches de B. anthracis, la réaction d'inflammation s'est accrue 2 jours après l'injection (les souris sont mortes dans cette expérience, la LD 50 sc dans le coussinet des pattes était plus forte que 10<sup>8</sup>). Lorsque les souris étaient inoculées avec 10<sup>8</sup> spores de la souche 7702 Sterne un oedème était observé pendant 6 jours, avec la souche mutante LF<sup>-</sup> l'oedème était visible pendant 2 jours seulement. Avec la souche B. subtilis MSY aucune réaction d'inflammation (10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> ou 10<sup>8</sup> spores en suspension) n'était observée. Finalement pour vérifier si l'induction de l'oedème était dépendante de la survie bactérienne dans le coussinet de la patte des souris infectées, une culture bactérienne a été suivie lorsque les souris étaient inoculées avec 10<sup>8</sup> spores de toutes les souches de B. anthracis testées.

Pour toutes les souches B. anthracis, le log 10 du comptage bactérien par patte décroissait rapidement 24 heures après l'injection par plus de 1,0 unité log et restait stable pendant 10 jours. Ceci indiquait que l'induction de l'oedème n'était pas corrélée avec la survie bactérienne au point de l'inoculation. Lorsque les souris étaient inoculées avec une suspension de 10<sup>8</sup> spores de B. subtilis, le log 10 du comptage bactérien décroissait de façon significative. Les spores étaient détruites 5 jours après l'infection. Ces données ont démontré que la souche de B. anthracis (même à la souche 7700) survivait plus longtemps que la souche B. subtilis dans les tissus de l'hôte.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

**TABLEAU 1 :****Souches bactériennes et plasmides utilisés**Souches bactériennes

| Souches                         | Plasmides    | Caractéristiques   |
|---------------------------------|--------------|--|
| B.anthraxis 7702                | pX01         | PA <sup>+</sup> EF <sup>+</sup> LF <sup>+</sup>                  |
| B.anthraxis 7700                | -            | Nal <sup>r</sup>   |
| B.anthraxis RP8 PA <sup>-</sup> | pX01-pag 322 | PA <sup>-</sup> EF <sup>+</sup> LF <sup>+</sup> Erm <sup>r</sup> |
| B.anthraxis RP9 EF <sup>-</sup> | pX01-cya 303 | PA <sup>+</sup> EF <sup>+</sup> LF <sup>-</sup> Kan <sup>r</sup> |
| B.anthraxis RP10                | pX01-lef 238 | PA <sup>+</sup> EF <sup>+</sup> LF <sup>-</sup> Kan <sup>r</sup> |
| LF <sup>-</sup>                 |              |  |
| E.coli HB101                    | pRK212.1     | Amp <sup>r</sup>   |
| E.coli JM105                    |              |  |
| B.Subtilis SMY                  |              |  |

Plasmides

- pAT18 : plasmide navette pX01, Erm<sup>r</sup> (Trieu Cuot et al, 1987)
- pCPL100 : plasmide recombinant pAT18 portant le fragment 3,5 kb ClaI-SacI DE PX01 codant pour LF. Erm<sup>r</sup>
- pCPL110 : dérivé de pCPL100 portant une cassette Kan<sup>r</sup> de 1,5 kb insérée dans le gène de structure LF délété d'un fragment 0,8 kb EcoRI Kan<sup>r</sup>. Erm<sup>r</sup>
- pMMA861 : plasmide recombinant pUC8 portant le fragment 3,17 kb EcoRI-BamHI de pX01 codant pour EF (Mock 1987) Amp<sup>r</sup>
- pMMA862 : dérivé de pMMA861 portant la cassette Kan<sup>r</sup> de 1,5 kb insérée dans le gène de structure EF délété du fragment HindIII fragment Amp<sup>r</sup> Kan<sup>r</sup>
- pMM110 : insérat de 3,57 kb d'ADN de pMMA861 cloné dans pAT18 Erm<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>

- B.anthraxis 7702 : souche Sterne 1939 J Vet Sci Anim  
Indust 13: 313-317
- B.anthraxis 7700 : souche dérivée de 7702 dépourvue  
de pX01
- B.anthraxis RP8 : souche dérivée de 7702
- E.coli HB101 : Trieu Cuot et al, 1987 FEMS  
Microbiol Letters 48: 289-294
- E.coli JM105 : Yannish-Perron et al, 1985 Gene  
33: 103-109

**TABLEAU 2 :****Activité adénylate cyclase dans les différents  
surnageants de culture de B. anthracis**

| Souches                | Activité Adénylate cyclase<br>nmol/min/ml surnageant |
|------------------------|--|
| Mutant EF <sup>-</sup> | 0  |
| Mutant PA <sup>-</sup> | 300  |
| Mutant LF <sup>-</sup> | 200  |
| Souche Sterne 7702     | 200  |

**Construction de souches doublement mutantes de  
B. anthracis**

Ces souches ont été construites selon les techniques décrites dans les pages précédentes. Elles produisent un seul des composants PA, EF ou LF.

### Méthodes

Les dénominations des souches et leurs caractéristiques sont les suivantes :

- RP31 : EF<sup>+</sup> LF<sup>-</sup> PA<sup>-</sup>

Le gène lef est inactivé par insertion de la cassette de résistance à la kanamycine (Kan<sup>R</sup>).

Le gène pag est inactivé par insertion de la cassette de résistance à l'erythromycine (Erm<sup>R</sup>).

- RPA4 : LF<sup>+</sup> EF<sup>-</sup> PA<sup>-</sup>

Le gène pag est inactivé par insertion de la cassette de résistance Erm<sup>R</sup>.

Le gène cya est inactivé par insertion de la cassette de résistance Kan<sup>R</sup>.

- RP42 : PA<sup>+</sup> EF<sup>-</sup> LF<sup>-</sup>

Le gène cya est inactivé par insertion de la cassette de résistance Erm<sup>R</sup>.

Le gène lef est inactivé par insertion de la cassette de résistance Kan<sup>R</sup>.

Ces trois souches ont été caractérisées biochimiquement par analyse des protéines contenues dans leurs surnageants de culture (selon la méthode de Western Blot).

## **II - EXPERIENCES D'IMMUNOPROTECTION**

Des expériences ont été entreprises chez la souris, dans le but d'étudier le pouvoir immunoprotecteur des souches mutantes. Les animaux ont reçu, par voie sous-cutanée, des spores de RP42 (PA<sup>+</sup>,

EF<sup>-</sup>, LF<sup>-</sup>) et de RP9 (PA<sup>+</sup>, EF<sup>+</sup>, LF<sup>-</sup>) un lot témoin d'animaux ne recevant rien.

Au bout de 40 jours, le challenge a été réalisé par injection en voie sous cutanée d'une dose létale ( $1,5 \cdot 10^9$  spores) de la souche Sterne.

Le pourcentage des animaux survivants a été déterminé :

90% et 85% des animaux ayant reçu respectivement RP42 et RP9 ont survécu à l'injection de la dose létale de la souche Sterne, alors que l'on n'observe aucune protection parmi le groupe témoin.

Ces premiers résultats sont significatifs et indiquent que les souches construites sont capables d'induire une immunoprotection active chez la souris.

## R E V E N D I C A T I O N S

1. Souche recombinante de B. anthracis, caractérisée par :

- sa capacité à induire chez un hôte animal ou humain, la production d'anticorps protecteurs contre des souches virulentes de B. anthracis,
- la mutation sur le plasmide pX01 d'au moins un gène donné codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez B. anthracis, cette mutation résultant en :

. la délétion de tout ou partie de ce gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique et,

. l'insertion au niveau du site de délétion de ce gène dans pX01, d'une cassette d'ADN permettant la sélection de la souche ainsi modifiée et empêchant la réversion de la souche recombinante, le gène ainsi muté étant alors soit dépourvu de la capacité à produire la protéine responsable de l'effet toxique pour laquelle il code, soit capable de coder pour une protéine tronquée dépourvue de son caractère toxique.

2. Souche recombinante de B. anthracis selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue du plasmide pX02, en particulier en ce qu'il s'agit de la souche STERNE 7702.

3. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le gène muté de pX01 est le gène lef codant pour la protéine létale LF.

4. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le gène muté de pX01 est le gène cya codant pour la protéine oedématogène EF.

5. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce



qu'elle est capable d'exprimer les protéines PA et EF et en ce qu'elle n'exprime pas la protéine LF.

6. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le plasmide pX01 est en outre muté au niveau du gène codant pour la protéine de PA, de façon telle que la protéine PA soit n'est pas exprimée dans la souche recombinante, soit n'est pas fonctionnelle dans la souche recombinante.

7. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est doublement mutée au niveau du plasmide pX01.

8. Souche recombinante de B. anthracis selon la revendication 7, caractérisée en ce que les gènes lef et pag sont inactivés, et notamment en ce qu'il s'agit de la souche RP31.

9. Souche recombinante de B. anthracis selon la revendication 7, caractérisée en ce que les gènes pag et cya sont inactivés, et notamment en ce qu'il s'agit de la souche RP4.

10. Souche recombinante de B. anthracis selon la revendication 7, caractérisée en ce que les gènes cya et lef sont inactivés, et notamment en ce qu'il s'agit de la souche RP42.

11. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la cassette d'ADN porte un gène de résistance à un antibiotique par exemple la kanamycine ou un marqueur métabolique.

12. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le fragment délété du gène de pX01 est un fragment d'au moins 0,1 kb de préférence 1 kb,

suffisant pour empêcher la production de la protéine pour laquelle il code naturellement.

13. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un acide nucléique hétérologue le cas échéant muté, codant pour un facteur déterminé immunogène ou susceptible de l'être, sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans B. anthracis.

14. Souche recombinante de B. anthracis selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'acide nucléique hétérologue est porté par le plasmide pXO1.

15. Souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle est sous forme de spores.

16. Souche recombinante selon la revendication 2 ou 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche RP9 déposée le 2 Mai 1991 à la CNCM sous le numéro I-1094.

17. Souche recombinante selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche RP10 déposée le 2 Mai 1991 à la CNCM sous le numéro I-1095.

18. Souche recombinante selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche RP8 déposée le 2 Mai 1991 à la CNCM sous le numéro I-1093.

19. Composition immunogène, permettant la production d'anticorps neutralisants et protecteurs vis à vis de B. anthracis chez l'hôte auquel elle est administrée, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif une souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, 16 à 18 en mélange avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

20. Composition de vaccin mixte, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une souche

recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, dans des conditions telles que son administration à un hôte déterminé permet la production d'anticorps protecteurs à la fois contre une infection par B. anthracis et contre l'organisme dont est issue la séquence d'acides aminés hétérologue.

21. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 19 ou 20, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, des souches RP42 ou RP9.

22. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisée en ce qu'elle comprend un adjuvant.

23. Vecteur recombinant, notamment choisi parmi les vecteurs de type conjugatif capable d'infecter à la fois des bactéries Gram-négatives et des bactéries Gram-positives en particulier E. coli et B. anthracis, stable et non intégratif chez B. anthracis et comprenant en un site non essentiel pour sa répllication, d'une part une séquence mutée d'au moins un gène codant pour une protéine responsable de l'effet toxique des toxines de B. anthracis, de telle façon qu'elle ne permet pas la production de cette protéine ou que cette protéine est produite sous une forme inactive s'agissant de l'effet toxique et d'autre part une cassette d'ADN susceptible de se comporter comme un reporteur, par exemple en conférant une résistance à un antibiotique par exemple la kanamycine ou en permettant une réaction métabolique sur un substrat donné, lorsque ce vecteur est introduit chez B. anthracis.

24. Vecteur recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce que le gène muté de pX01 est le gène lef.

25. Vecteur recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce que le gène muté de pXO1 est le gène cya.

26. Vecteur recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce que le plasmide pXO1 est muté au niveau de deux gènes, et notamment au niveau des gènes LF et PA ou, EF et PA ou, EF et LF.

27. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, caractérisé en ce qu'il contient en outre un ADN hétérologue codant pour une protéine immunogène déterminée.

28. Séquence d'ADN codant pour une protéine responsable de l'effet toxique de B. anthracis, caractérisée en ce qu'elle est mutée par délétion dans des conditions telles que la protéine n'est pas produite ou est produite sous une forme tronquée inactive, la mutation de la séquence étant en particulier située au niveau du gène lef ou du gène cya.

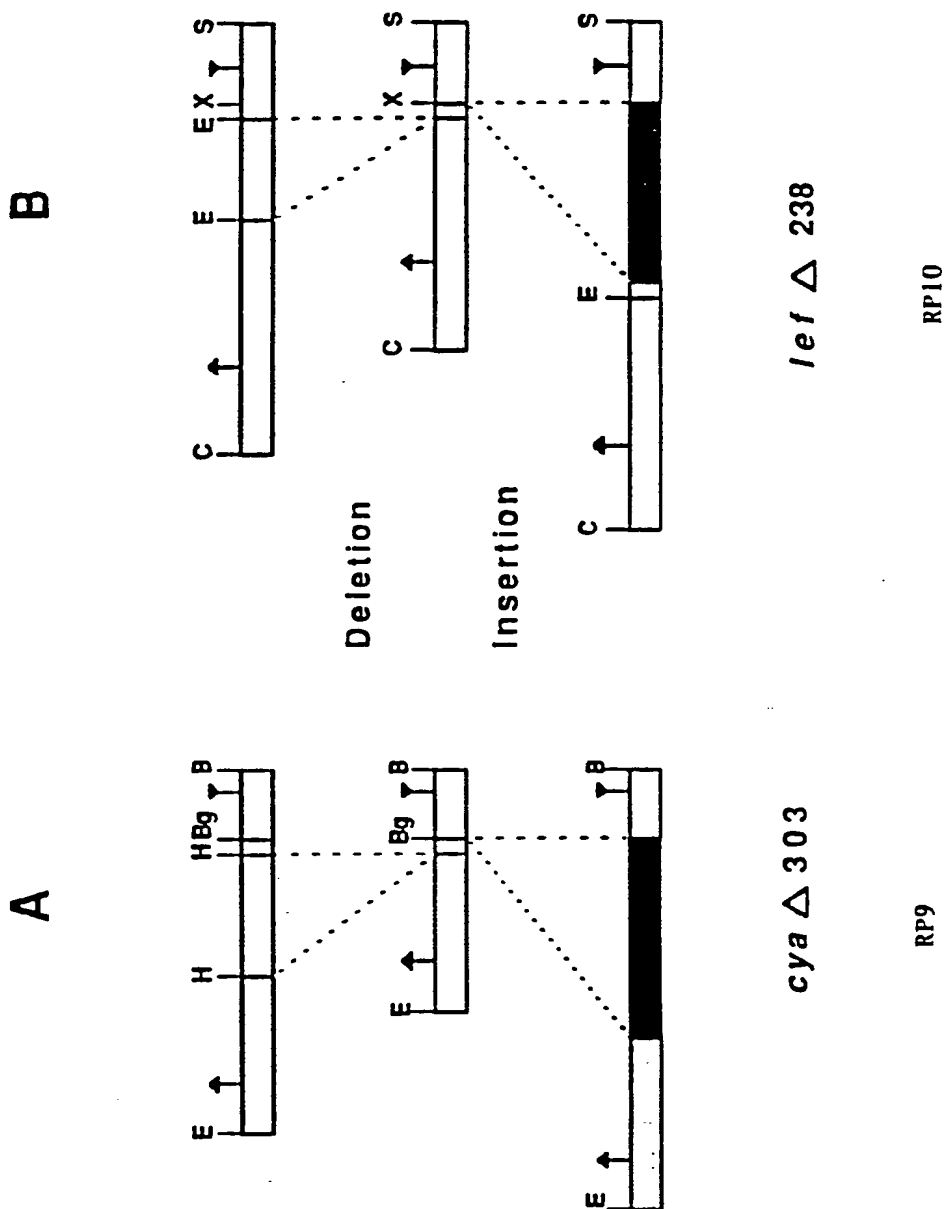
29. Procédé pour la préparation d'une souche recombinante de B. anthracis selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 16 à 18 comprenant les étapes suivantes :

- la modification de souches déterminées de B. anthracis par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 25 ou 27 dans des conditions permettant l'intégration de la séquence mutée du gène cya ou de la séquence mutée du gène lef ainsi que de la cassette reporteur et le cas échéant de l'acide nucléique hétérologue au niveau du plasmide pXO1 de façon telle que la séquence cya mutée ou la séquence lef mutée est insérée par recombinaison homologue dans pXO1 respectivement au niveau du gène cya ou du gène lef d'origine,

- la récupération des souches B. anthracis recombinantes, après élimination de la fraction du vecteur recombinant non intégré dans pX01.

1/2

**FIGURE 1**



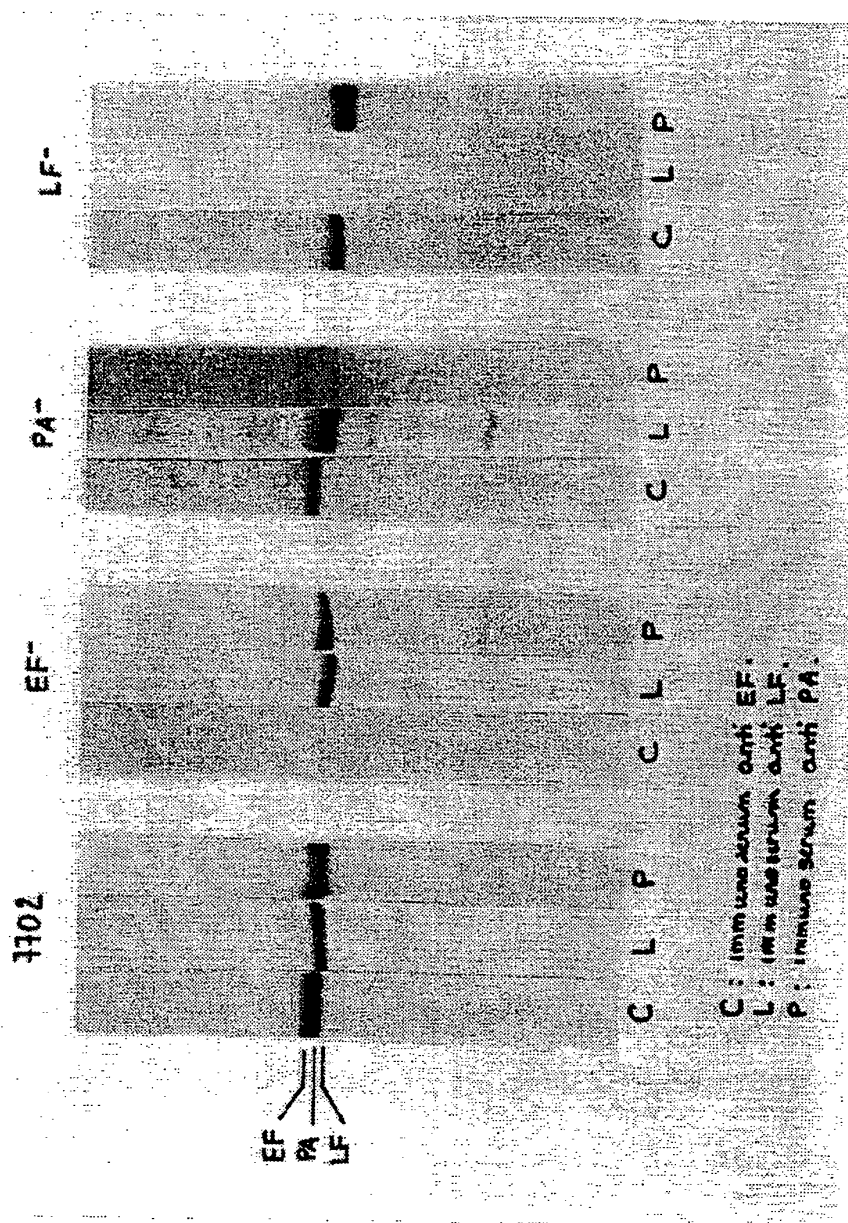


FIGURE 2

Fig 2.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00397

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5 C12N1/21; C12N15/70; C12N15/75; C12N15/31; A61K39/07  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | MOLECULAR MICROBIOLOGY<br>Vol. 4, No. 7, 1990, NEW YORK US<br>Pages 1111-1117;<br>CATALDI A. ET AL.: 'Construction and<br>characterization of a protective antigen -<br>deficient Bacillus anthracis strain'<br>cited in the application<br>see the whole document | 1                     |
| Y         |  | 15, 16, 18,           |
| A         |  | 20, 21                |
|           |  | 6                     |
| Y         | TOXLINE DATABASE, Bethesda MD,<br>Ivins BE.: " Search for a new-generation human<br>anthrax vaccine"; Abstract NTIS/AD-A190 178-4<br>& GOVT REPORTS ANNOUNCEMENTS & INDEX<br>issue 14, 1988  | 15, 16,<br>18, 20, 21 |
| A         |  | 3-6, 22               |
|           | ---<br>-/-   |                       |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 1992 (09.09.92)

Date of mailing of the international search report

6 October 1992 (06.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00397

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                       |
|-----------|--|---|
| Y         | GB, A, 2 181 435 (ONCOGEN) 23 April 1987<br>see abstract; claims 56-100<br>---   | 16  |
| A         | BIOSIS PREVIEWS DATABASE, Biosis, Philadelphia, PA<br>Singh Y. et al.: "A deleted variant of Bacillus-<br>anthracis protective antigen is non-toxic and blocks<br>anthrax toxin action in-vivo"; Abstract<br>No. 89025806, & J. Biol. Chem., 264, 32, 1989, 19103-7<br>--- | 1,6,15,<br>18,20,21                         |
| A         | WO, A, 9 011 688 (WASHINGTON UNIVERSITY) 18<br>October 1990<br>see abstract; claims 1-10<br>---  | 7-10,21,<br>26                              |
| A         | WORLD PATENTS INDEX LATEST<br>Week 9042,<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>AN 90-319062 [42]<br>& SU, A, 1 551 382 (KISH MEDICINE INST) 23 March 1990<br>see abstract<br>---  | 14  |
| A         | INFECTION AND IMMUNITY<br>Vol. 54, No. 2, 1986, WASHINGTON US<br>pages 537 - 542;<br>IVINS B E; WELKOS S L: 'CLONING AND EXPRESSION<br>OF THE BACILLUS-ANTHRACIS PROTECTIVE ANTIGEN GENE<br>IN BACILLUS-SUBTILIS'<br>see the whole document<br>---                         | 1,23,28                                     |
| P,X       | INFECTION AND IMMUNITY<br>Vol. 59, No. 10, 1991, WASHINGTON US<br>pages 3472 - 3477;<br>PEZARD C; BERCHE P; MOCK M: 'CONTRIBUTION OF<br>INDIVIDUAL TOXIN COMPONENTS TO VIRULENCE OF<br>BACILLUS-ANTHRACIS'.<br>see the whole document<br>---                               | 1-6,<br>11-13,<br>16-19,<br>21-25,<br>27-28 |

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9200397  
SA 59746

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 09/09/92

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| GB-A-2181435                              | 23-04-87            | AU-B- 608205               | 28-03-91            |
|   |                     | AU-A- 6299286              | 09-04-87            |
|   |                     | BE-A- 905492               | 25-03-87            |
|   |                     | CH-A- 676247               | 28-12-90            |
|   |                     | DE-T- 3690508              | 23-06-88            |
|   |                     | FR-A- 2593519              | 31-07-87            |
|   |                     | FR-A- 2587720              | 27-03-87            |
|   |                     | JP-A- 63068075             | 26-03-88            |
|   |                     | LU-A- 86608                | 05-04-88            |
|   |                     | NL-A- 8602422              | 16-04-87            |
|   |                     | SE-A- 8604007              | 26-03-87            |
|   |                     | WO-A- 8702038              | 09-04-87            |
|   |                     | US-A- 5081029              | 14-01-92            |
| WO-A-9011688                              | 18-10-90            | AU-A- 5355990              | 05-11-90            |
|   |                     | CA-A- 2013572              | 30-09-90            |
|   |                     | CN-A- 1046463              | 31-10-90            |
|   |                     | EP-A- 0465561              | 15-01-92            |

EPO FORM P007

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00397

|   |  |   |
|---|--|---|
| <b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer)  |  |   |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB   |  |   |
| CIB 5   | C12N1/21;<br>A61K39/07   | C12N15/70;<br>C12N15/75;<br>C12N15/31       |
| <b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>   |  |   |
| Documentation minimale consultée <sup>1</sup>   |  |   |
| Systeme de classification   | Symboles de classification   |   |
| CIB 5   | C07K   |   |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté  |  |   |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>   |  |   |
| Catégorie <sup>9</sup>  | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>  | No. des revendications visées <sup>14</sup> |
| X   | MOLECULAR MICROBIOLOGY<br>vol. 4, no. 7, 1990, NEW YORK US<br>pages 1111 - 1117;<br>CATALDI A. ET AL.: 'Construction and<br>characterization of a protective<br>antigen-deficient Bacillus anthracis strain'<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier | 1   |
| Y   |  | 15, 16,<br>18, 20, 21                       |
| A   |  | 6   |
| Y   | TOXLINE DATABASE, Bethesda MD,<br>Ivins BE.: "Search for a new-generation human<br>anthrax vaccine"; Abstract NTIS/AD-A190 178-4<br>& GOVT REPORTS ANNOUNCEMENTS & INDEX<br>issue 14, 1988   | 15, 16,<br>18, 20, 21                       |
| A   |  | 3-6, 22                                     |
| <p><sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> |  |   |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>  |  |   |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée   | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale   |   |
| 09 SEPTEMBRE 1992   | 06 OCT 1992  |   |
| Administration chargée de la recherche internationale   | Signature du fonctionnaire autorisé  |   |
| OFFICE EUROPEEN DES BREVETS   | GURDJIAN D.  |   |

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (Janvier 1985)

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS<sup>16</sup>(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA  
DEUXIEME FEUILLE)

| Catégorie * | Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire<br>des passages pertinents <sup>17</sup>   | No. des revendications<br>visées <sup>18</sup> |
|-------------|---|--|
| Y           | GB,A,2 181 435 (ONCOGEN) 23 Avr 11 1987<br>voir abrégé; revendications 56-100<br>---  | 16   |
| A           | BIOSIS PREVIEWS DATABASE ,Biosis,Philadelphia,PA<br>Singh Y. et al.: "A deleted variant of Bacillus-<br>anthracis protective antigen is non-toxic and<br>blocks anthrax toxin action in-vivo"; Abstract<br>NO.89025806,&J.Biol.Chem.,264,32,1989,19103-7<br>--- | 1,6,15,<br>18,20,21                            |
| A           | WO,A,9 011 688 (WASHINGTON UNIVERSITY) 18<br>Octobre 1990<br>voir abrégé; revendications 1-10<br>---  | 7-10,21,<br>26                                 |
| A           | WORLD PATENTS INDEX LATEST<br>Week 9042,<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>AN 90-319062 [42]<br>& SU,A,1 551 382 (KISH MEDICINE INST) 23 Mars<br>1990<br>voir abrégé<br>---  | 14   |
| A           | INFECTION AND IMMUNITY<br>vol. 54, no. 2, 1986, WASHINGTON US<br>pages 537 - 542;<br>IVINS B E; WELKOS S L: 'CLONING AND EXPRESSION<br>OF THE BACILLUS -ANTHRACIS PROTECTIVE ANTIGEN<br>GENE IN BACILLUS-SUBTILIS.'<br>voir le document en entier<br>---        | 1,23,28  |
| P,X         | INFECTION AND IMMUNITY<br>vol. 59, no. 10, 1991, WASHINGTON US<br>pages 3472 - 3477;<br>PEZARD C; BERCHE P; MOCK M: 'CONTRIBUTION OF<br>INDIVIDUAL TOXIN COMPONENTS TO VIRULENCE OF<br>BACILLUS - ANTHRACIS .'<br>voir le document en entier<br>---             | 1-6,<br>11-13,<br>16-19,<br>21-25,<br>27-28    |

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200397  
SA 59746

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 09/09/92.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| GB-A-2181435                                    | 23-04-87               | AU-B- 608205                            | 28-03-91               |
|   |                        | AU-A- 6299286                           | 09-04-87               |
|   |                        | BE-A- 905492                            | 25-03-87               |
|   |                        | CH-A- 676247                            | 28-12-90               |
|   |                        | DE-T- 3690508                           | 23-06-88               |
|   |                        | FR-A- 2593519                           | 31-07-87               |
|   |                        | FR-A- 2587720                           | 27-03-87               |
|   |                        | JP-A- 63068075                          | 26-03-88               |
|   |                        | LU-A- 86608                             | 05-04-88               |
|   |                        | NL-A- 8602422                           | 16-04-87               |
|   |                        | SE-A- 8604007                           | 26-03-87               |
|   |                        | WO-A- 8702038                           | 09-04-87               |
|   |                        | US-A- 5081029                           | 14-01-92               |
| WO-A-9011688                                    | 18-10-90               | AU-A- 5355990                           | 05-11-90               |
|   |                        | CA-A- 2013572                           | 30-09-90               |
|   |                        | CN-A- 1046463                           | 31-10-90               |
|   |                        | EP-A- 0465561                           | 15-01-92               |

EP0 FORM P0412

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

